

ニンジン配合製剤中のニンジンサポニンの定量

Quantitative analysis of ginsenoside in drug compounded *Panax ginseng*

富山県薬事研究会分析部会 —ニンジン配合製剤中のニンジンサポニンの分析分科会—

Division of Analytical Chemistry

Toyama Pharmaceutical Research Association

永井 喜美	株式会社延寿堂
Kimi NAGAI	Enjudo Co., Ltd.
牧村 貴子	株式会社廣貫堂
Takako MAKIMURA	Kokando Co., Ltd.
市井 満美子	救急薬品工業株式会社
Mamiko ICHII	Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
俣野 豊	クラシエ製薬株式会社
Yutaka MATANO	Kracie Pharma, Ltd.
荒木 安子	クラシエ製薬株式会社
Yasuko ARAKI	Kracie Pharma, Ltd.
京藤 綾子	新新薬品工業株式会社
Ayako KYOTO	Shinshin Pharmaceutical Co., Ltd.
中島 恵子	中央薬品株式会社
Keiko NAKAJIMA	Chuoh Pharmaceutical Co., Ltd.
中村 直子	共栄製薬株式会社
Naoko NAKAMURA	Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.
横田 洋一	富山県薬事研究所
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research.

緒言

ニンジンには健胃、強壯強精等の効能を有するニンジンサポニンを有効成分とする生薬である。これまでに、HPLC 法によるニンジンサポニンの定量は種々検討、報告されており、このうち、ニンジン中のギンセノシド Rg₁ 及び Rb₁ についての定量法が第 15 改正日本薬局方に収載された。今回、演者らは、ニンジン配合製剤中のニンジンサポニンの定量法を確立する事を目的とし、滋養強壯保健薬中のギンセノシド Rg₁ の HPLC 定量法を検討することとした。

実験

1. 試料

(1) モデル製剤

滋養強壯保健薬のモデル製剤の処方構成を Table1 に示した。

Table1 モデル製剤の処方構成

滋養強壯保健薬					
1 日量 (18 丸) 中重量 (mg)					
ニンジン乾燥エキス末	450	コウボク末	90	オウギ末	200
エンゴサクエキス	60	トウキ末	200	沈降炭酸カルシウム、バレイシヨデンプン	
ジャショウシエキス	30	シャクヤク末	200	(適量)、寒梅粉、サリチル酸、	1253
オキソアミヂン末	100	センキュウ末	200	タルク (適量)、薬用炭、	
ゴオウ	5	ケイヒ末	200	アラビアゴム末、精製セラック	
				合計	2988

(2) ブランク試料

モデル製剤の処方構成からニンジン乾燥エキス末を除いて調製したものを用いた。

2. 標準品

和光純薬工業製 ギンセノシド Rg₁、Re を用いた。

3. モデル製剤を用いたミニカラム処理の検討

試料約 1g を精密に量り、薄めたメタノール (3→5) 30mL を加えて 15 分間振り混ぜた後、薄めたメタノール (3→5) を加えて正確に 50mL とし、遠心分離した。上澄み液をろ過し、ろ液 25mL を正確にとり、水を用い

て正確に 50mL とし、抽出液とした。コンディショニング¹⁾済みの各ミニカラム (Table2) に抽出液 5mL を正確に加え、薄めたメタノール (3→10) 5mL で洗浄した後、薄めたメタノール (3→5) 5mL で溶出し、薄めたメタノール (3→5) を加えてそれぞれを正確に 10mL とし、HPLC 法により、Table3 に示した分析条件を用いて試料溶液中のギンセノシド Rg₁ を測定した。

1) それぞれのミニカラムをメタノール 5mL、水 5mL の順で洗浄した。

Table2 ミニカラムの特性

	ミニカラム	結合官能基	充填剤量(mg)
イオン 交換性	Bond Elut Jr. SAX	トリメチルアミノプロピル基	500
	TOYOPAK DEAE	ジエチルアミノエチル基	—
	Oasis MAX plus	C18+第 4 級アミン	225
	Oasis WAX plus	C18+第 4 級アミン(弱陰イオン交換基)	225
	Sep-pak plus NH ₂	アミノプロピル基	360
逆相系	Sep-pak plus C18	C18	360
シリカゲル	Bond Elut Jr. C18	C18	500

Table3 HPLC 条件

検出器	紫外吸光光度計(分析波長:203nm)
カラム	粒子径 5 μm, 内径 4.6mm, 長さ 15cm の ODS カラム
カラム温度	30°C
移動相	0.05mol/L リン酸二水素ナトリウム試液/アセトニトリル混液(4:1)
流量	ギンセノシド Rg ₁ の保持時間が約 25 分
注入量	10 μL

4. ODS カラムの検討

Table4 に示した ODS カラムを用いた。

Table4 ODS カラム

ODS カラム(内径 4.6mm、長さ 15cm)
CAPCELL PAK C18 MG
L-column ODS
Phenomenex Luna C18
TSK-gel ODS-80T
YMC Pack ODS-A

5. 試料調製法

試料を粉末とし、約 1g を精密に量り、薄めたメタノール (3→5) 30mL を加えて 15 分間振り混ぜた後、薄めたメタノール (3→5) を加えて正確に 50mL とし、遠心分離した。上澄み液をろ過後、ろ液 25mL を正確にとり、水を用いて正確に 50mL とし、抽出液とした。抽出液 5mL を正確にとり、SAX カラムと C18 カラムを連結させたものに通導し、その後 SAX カラムを外し、C18 カラムを薄めたメタノール (3→10) 5mL で洗浄した後、薄めたメタノール (3→5) で溶出した。溶出液を薄めたメタノール (3→5) で正確に 5mL とし、試料溶液とした。

別に、ギンセノシド R_{g1} 、ギンセノシド R_e 約 10mg をそれぞれ精密に量り、薄めたメタノール (3→5) を加えて正確に 100mL とし、それぞれの標準原液とした。この液 20mL をそれぞれ正確にとり、薄めたメタノール (3→5) を加えて正確に 100mL とし、標準溶液とした。

試料溶液及び標準溶液につき、HPLC 法により、Table3 の分析条件を用いて試料溶液中のギンセノシド R_{g1} を測定した。

6. 添加回収

ブランク試料約 1g をとり、試料調製の項と同様に操作してブランク溶液を得た。また、ギンセノシド R_{g1} 標準原液 25mL を正確にとり、水を加えて正確に 100mL とし、添加回収用標準溶液とした。ブランク溶液 5mL に添加回収用標準溶液 4、6、8mL をそれぞれ正確に加え、各ミニカラム処理して得られた各溶液中のギンセノシド R_{g1} 量を測定した。

7. 5. の試料調製法に従い市販品を調製し、HPLC 法により市販品中のギンセノシド R_{g1} 含量を測定した。

結果

1. ミニカラム処理

ミニカラム未処理のモデル製剤を分析した結果、ギンセノシド R_{g1} のピークに重なる妨害ピーク(*)が顕著に認められたため、前処理による妨害ピークの除去が必要であると考えられた (Fig.1)。また C18 カラム処理でいずれもギンセノシド R_{g1} のピークと同保持時間に妨害ピークが認められた (Fig.2)。

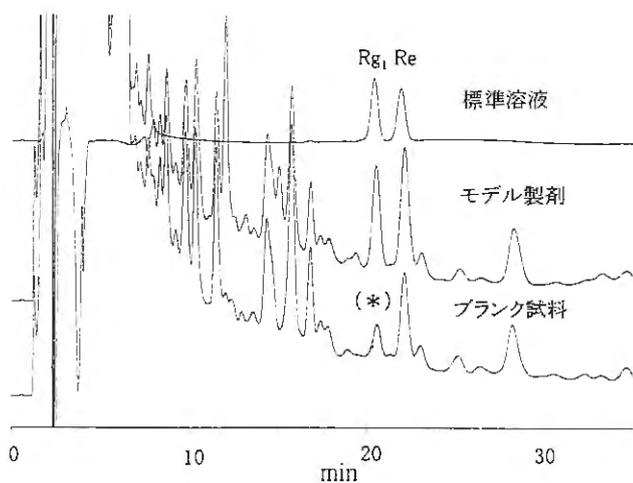


Fig.1 ミニカラム未処理のクロマトグラム
(L-column ODS)

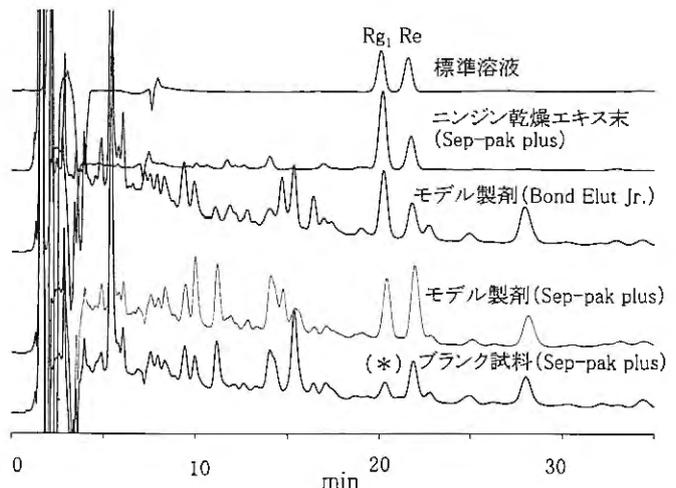


Fig.2 ミニカラム C18 処理後のクロマトグラム
(L-column ODS)

また、イオン交換性充填剤のミニカラムを用いて得られた溶液中のギンセノシド Rg_1 を分析した結果、MAX カラム及び WAX カラムでは完全に溶出しなかった。SAX カラム、DEAE カラム及び NH_2 カラムではほぼ同等のクロマトグラムを示したが、いずれもギンセノシド Rg_1 近傍の妨害ピークを除去できず (Fig.3)、これらのカラムを単独で用いた場合、ギンセノシド Rg_1 妨害ピークの除去は困難であった。そこで、トリメチルアミノプロピル基を官能基として有する SAX カラムと C18 カラムを連結し、SAX カラムに弱陰イオン性成分を、また C18 カラムにギンセノシド Rg_1 を保持させ、その後 C18 カラムのギンセノシド Rg_1 を溶出させることとした。その結果、若干の妨害成分は認められ、ミニカラム処理ではギンセノシド Rg_1 の近傍ピークを完全に除去することができなかった (Fig.4)。そこで、この近傍ピークについては、HPLC 分析に使用する各種 ODS カラムでの分離挙動による除去を試みた。

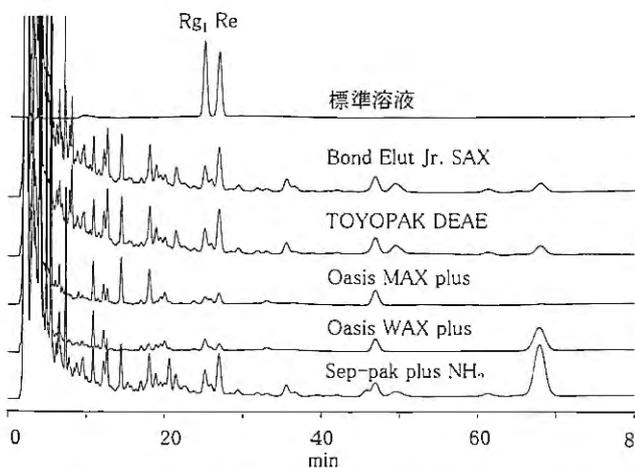


Fig.3 イオン交換ミニカラム処理後のモデル製剤の
クロマトグラム (L-column ODS)

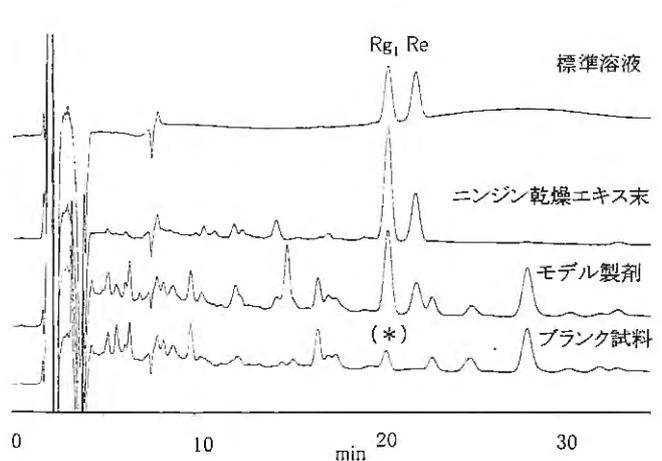


Fig.4 Bond Elut Jr.SAX と C18 ミニカラム処理後の
クロマトグラム (L-column ODS)

2. ODS カラムの検討

参加各社で5種類の市販 ODS カラムを用い、モデル製剤中のギンセノシド R_{g1} の定量を試みた結果、全てのカラムについて、ギンセノシド R_{g1} と妨害ピークとの分離はできなかったが、TSK-gelカラムを用いたとき、近傍ピークとの分離、ギンセノシド R_{g1} と R_e の分離度及びニンジン乾燥エキス末から算出したギンセノシド R_{g1} の回収率が良好であることが分かった(Table5)。

Table5 ODS カラムの検討

	CAPCELL PAK C18 MG	L-column ODS	Phenomenex Luna C18	TSK-gel ODS-80Ts	YMC Pack ODS-A
R_{g1} と R_e の分離度	1.90	2.07	1.37	2.07	1.43
滋養強壮保健薬中の R_{g1} の含量 (mg/g)	1.08	1.02	1.20	0.96	0.88
ニンジン乾燥エキス末中の R_{g1} 量から 製剤に換算した含量 A (mg/g) ²⁾			0.92		
R_{g1} の回収率(%)	117.4	110.9	130.4	104.5	95.7

2) $A = \text{ニンジン乾燥エキス末中含量(mg/g)} \times 450 / 2988$

3. 添加回収

TSK-gel カラムを用いて、ギンセノシド R_{g1} の添加回収実験を行った結果、ほぼ全社で回収率が $100 \pm 10\%$ であった(Table6)。

Table6 ギンセノシド R_{g1} の添加回収実験結果

添加した R_{g1} 量 (mg)	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	H社
0.09070	99.2	104.0	109.8	92.1	90.2	98.5	93.5	92.3
0.13605	108.3	109.3	111.3	100.8	99.7	103.6	114.2	101.5
0.18140	98.3	92.0	103.0	94.8	95.1	99.2	106.0	96.6

4. 市販品の定量

今回検討した定量法を用いて、各社で市販品中のギンセノシド R_{g1} の分析を行った。その結果、ギンセノシド R_{g1} の室間再現性は10%以下であり、本法はギンセノシド R_{g1} の品質管理に適用できるものと考えられた(Table7)。各社で得られたギンセノシド R_{g1} のクロマトグラムを Fig.5 に示す。

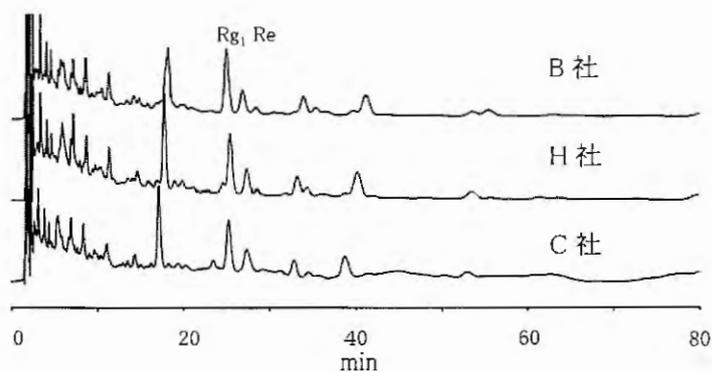


Fig.5 市販品中のギンセノシド Rg₁ のクロマトグラム
(TSK-gel ODS-80Ts)

Table7 市販品中のギンセノシド Rg₁ の定量

製造元	含量 (mg/g)					平均	CV (%)
	B社	C社	D社	F社	H社		
1	1.15	0.98	1.03	1.07	1.00	1.1	6.7
2	1.13	0.88	1.00	0.94	0.92	1.0	10
3	1.19	1.01	1.05	1.08	1.00	1.1	7.1
システムの性能、分離度 (Rg ₁ /Re)	1.76	1.96	2.00	1.89	1.90	—	—
システムの再現性、CV (% , n=6)	0.18	0.53	0.62	0.72	0.09	—	—

まとめ

今回、ニンジン乾燥エキス粉末配合の滋養強壮保健薬について、イオン交換系の SAX カラム及び逆相シリカゲル系の C18 カラムを連結する前処理法を用い、更に HPLC カラムとして TSK-gel を用いて分析することで、ギンセノシド Rg₁ のピーク付近の妨害成分をほぼ除去することができ、本成分の定量が可能となった。今後は、分析時間の短縮化等が課題であると考ええる。

富山県産サイコの成分について

—薬用植物指導センターでのミシマサイコの栽培—

Component of BUPLEURI RADIX Produced in TOYAMA Prefecture

—Cultivation of *Bupleurum falcatum* L.

in

Medical Plants Research Center of Toyama Prefecture—

田中 彰雄 寺西 雅弘 村上 守一
Akio TANAKA Masahiro TERANISHI Morikazu MURAKAMI
薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒言

日本薬局方でサイコはミシマサイコ *Bupleurum falcatum* Linne の根と規定されており、第十五局からは総サイコサポニン(サイコサポニン a 及びサイコサポニン d)0.35%以上の含量規定が設けられた。その成分含量測定法はサイコサポニンのアグリコン(フリー体)に加え、これまで従来の試験法で定量されなかったアシル体をケン化して、それを合せた総サポニン量を測定する定量法である。

これまで富山県薬用植物指導センターでミシマサイコの栽培をしてきたが、そのサイコのサポニン含量は従来の試験法では市場品と比較して非常に低値であった。しかし、この局方の試験方法では従来の試験法より高い値を示した。つまりセンター産のサイコはアシル体を多く含むことが推測された。その要因(種子の特性、栽培条件、土壌・気象条件など)を調べるために2系統の種子を用い、県内の2ヶ所で比較栽培試験を行ったので、その1年目の結果を報告する。

実験方法

1. 栽培試験

1) 種子

薬用植物指導センターで自家採種した種子(以下種子Cと略す)と富山大学薬用植物園で採種した種子(以下種子Dと略す)の2系統の種子

2) 栽培地

中新川郡上市町広野 薬用植物指導センターの圃場と富山市本宮(栗巣野)の試験圃場の2箇所

3) 栽培方法

- (1) 播種は上市では4月末に、栗巣野では6月に実施する。播種は10a当り2Lの量を播き、畝幅100cmで3条筋蒔きにする。
- (2) 間引きは行わず、2年目に摘芯をする。
- (3) 肥料は10a当たり、石灰窒素(60kg)、鶏糞(300kg)、苦土石灰(100kg)、過磷酸石灰(60kg)を元肥とし、過磷酸石灰(20kg)、燐加安15号(40kg)を追肥として6月にする。
- (4) 栽培を2年栽培とする。

[栽培暦]

4—5—6—7—8—9—10—11—12—1—2—3
「播種」 「除草・追肥」
「生育調査・試料採取」 「生薬調製・含量試験」

(2年目)

4—5—6—7—8—9—10—11—12—1—2—3
「除草・追肥」 「掘取」
「生育調査・試料採取」 「生薬調製・含量試験」

2. 成分含量試験

1) 試料作製方法

9月～12月までの期間、幅1mの区画の3ヶ所を掘り取り、根の長さ重量を測定し、その後凍結保存し定量用試料とした。(粟巣野は11月のみ)

市販品キザミは県立中央病院採用品(中国産)、市販品粉末は薬事研究所所有品を試料とした。

2) 総サポニン量

日本薬局方の成分含量測定法による。

3) フリー体量

日本薬局方の成分含量試験法の50℃で一時間のケン化操作を除いた試験法による。

4) アシル体量

総サポニン量からフリー体量を減じた量をアシル体量とする。

結果及び考察

1. 生育状況

種子Dの発芽率は低く、また生育が遅れていたが徐々に回復した。



写真；上市のセンター圃場の状況(11月)

2. 根の生育

種子 C と種子 D で発芽率の差があり、株数で種子 C は 59.7 本、種子 D は 33.0 本と差があった。11 月、12 月の根の重量で大きな差がでた。これは種子 D が適度に間引きされた状態になり根の成長が良くなったと思われる。

粟巣野は高冷地であり、6 月に播種 11 月に掘り取ったため生育期間が短く、気温も低く生育が非常に悪く、根の成長も良くない。

月 場所	種子 C			種子 D		
	長さ(cm)	生重量(g)	乾燥重量(g)	長さ(cm)	生重量(g)	乾燥重量(g)
9 月 上市	8.4	0.23	0.10	8.3	0.20	0.09
10 月 上市	13.5	1.03	0.36	13.7	0.98	0.32
11 月 上市	17.8	1.35	0.41	17.6	1.61	0.49
12 月 上市	18.7	1.41	0.53	19.0	2.41	0.87
11 月 粟巣野	12.9	0.83	0.23	17.7	0.97	0.25

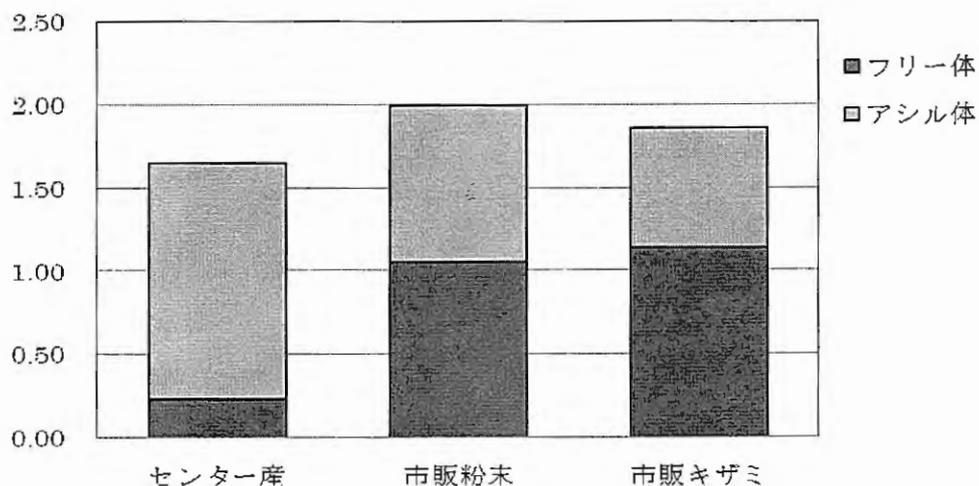
表 1. 根の長さ重量

3. サポニン含量

1) 市販品との比較

センター産と市販品のキザミと粉末を試験したところ、総サポニンで大きな差はなかったフリー体量に大きな差があった。フリー体の試験法は従来の試験法に近く、これまでセンター産の低値であったのが理解される。

つまりセンター産のサイコにはフリー体が少なく、アシル体が多い特性がある。

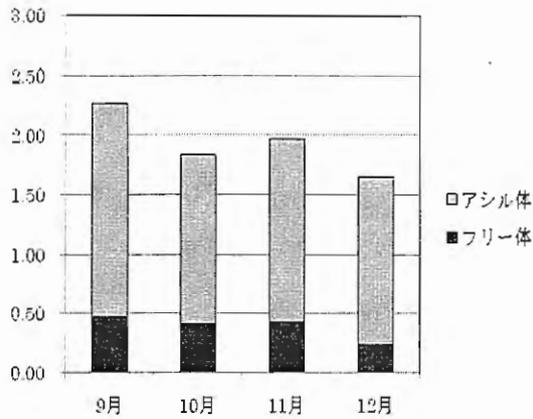


グラフ 1. センター産と市販品のサポニン

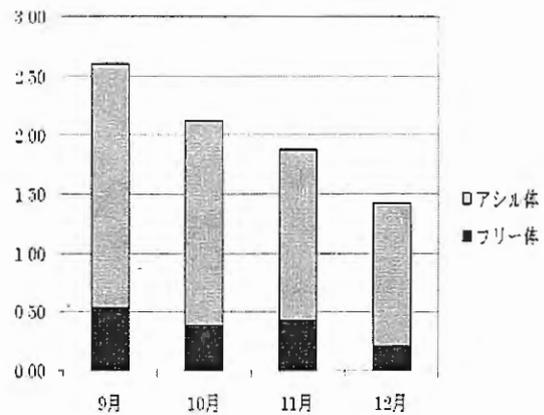
2) 月別の変化

月別の変化を示す。種子 C、種子 D ともに成長に伴い含量は低下する。これは成長に伴い第一次代謝産物が増加するためである。

アシル体が多い特性は生育当初からあり、その特性は成長によってもあまり変化しない。



グラフ2. 種子Cの月別変化



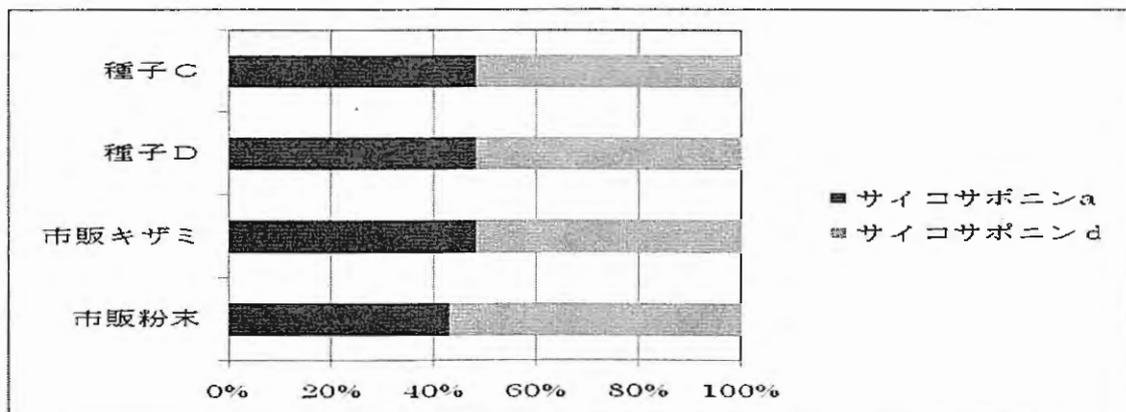
グラフ3. 種子Dの月別変化

3) サイコサポニンaとサイコサポニンdの割合

種子C、Dと市販品とのサイコサポニンaとdの量を示す。いずれもその割合に大きな差は認められない。

	サイコサポニンa	サイコサポニンd
種子C	0.80	0.85
種子D	0.69	0.74
市販品キザミ	0.90	0.96
市販品粉末	0.86	1.14

表2. サイコサポニンaとサイコサポニンdの含量%

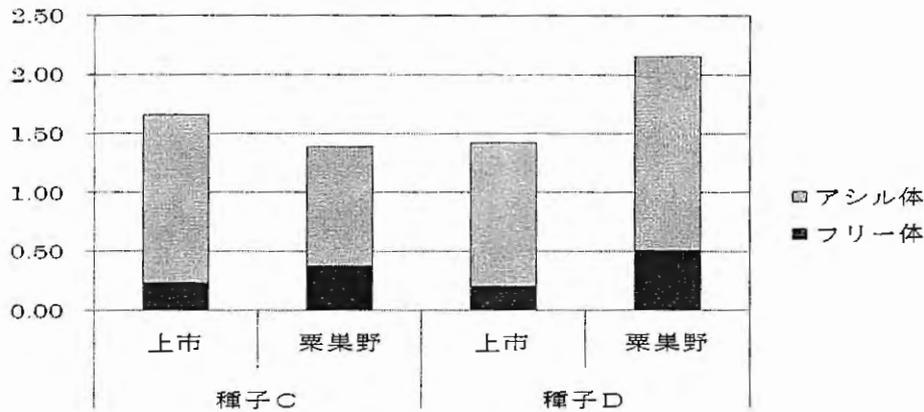


グラフ4. サイコサポニンaとサイコサポニンdの割合

4) 栽培地の比較

粟巣野での栽培は生育が良くなく、特に種子 D の極端にひげ根の部分が多かった。種子 D のサポニン含量が高値の要因と思われる。

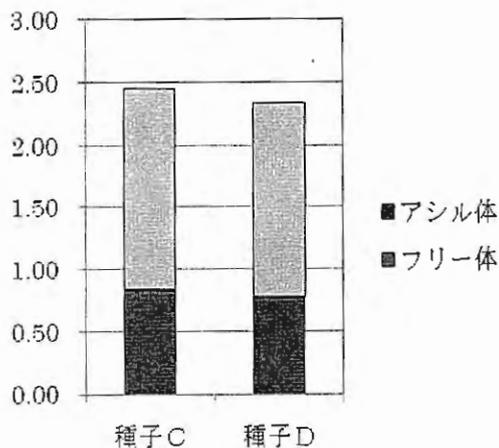
アシル体が多い特性は変化しないが、粟巣野の方がその特性は少ない。



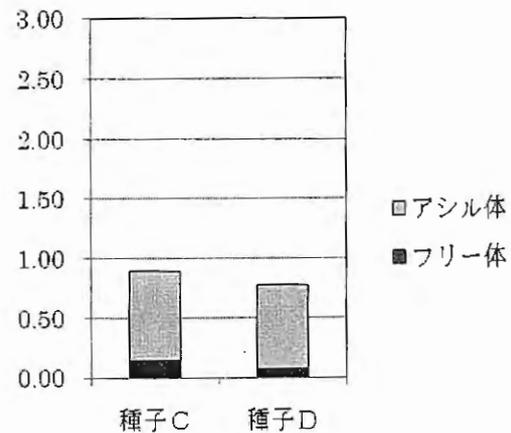
グラフ5. 上市と粟巣での栽培

5) ひげ根と葉

ひげ根は12月に採取し、葉は9月に採取した。ひげ根に多くのサポニンが存在するが、これはサポニン類が表皮に多く存在することを示す。葉にも少ない量が存在する。アシル体の多い特性は葉にもひげ根にも小さいがある。



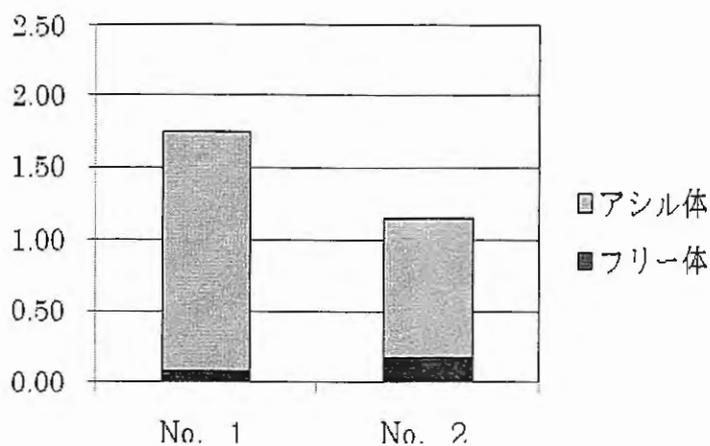
グラフ6. ひげ根のサポニン



グラフ7. 葉のサポニン

6) マンシュウミシマサイコのサポニン

センターの標本園に植栽されていたミシマサイコの変種のマンシュウミシマサイコ(北柴胡)を掘り取り含量試験を行った結果を示す。マンシュウミシマサイコはミシマサイコの仲間の中でも、北の寒い場所に自生する種類です。この種でもフリー体が少なくアシル体が多い特性が強くみられた。



グラフ8. マンシュウミシマサイコのサポニン

3. まとめ

- 1) 粟巣野で栽培は気温や日照時間が不足し、適地ではなかった。
- 2) これまでセンター産のサポニン含量が低いとされたのは試験法によるもので、総サポニン含量は市販製品とほぼ同等であり、むしろアシル体の割合が多いという特性がある。この特性は生育当初からあり、種子や栽培土壌を変えてもあまり変化しなかった。

今回の試験では富山で栽培したミシマサイコにすべてこの特性が現われており、種子の特性や富山の気象条件がその要因に考えられる。今後は2年目の含量の変化や産地の明瞭な市場品のサイコの試験や系統の異なる種子での栽培試験を予定している。

HPLCにおける移動相溶媒削減について (第4報)

—高極性物質用 ODS カラムの品質評価—

Economizing on the solvents of the mobile phase in high performance liquid chromatography (Part 4)

- Quality evaluation of ODS columns for hydrophilic substances -

—富山県薬事研究会分析部会—環境にやさしい分析法分科会 (HPLC) —

Division of Analytical Chemistry

Toyama Pharmaceutical Research Association

安田 美奈子	株式会社池田模範堂	高尾 泰昌	救急薬品工業株式会社
Minako YASUDA	Ikeda Mohando Ltd.	Yasumasa TAKAO	Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
○勝部 祐至	クラシエ製薬株式会社	秋元 住江	株式会社廣貫堂
Yuji KATSUBE	Kracie Pharma, Ltd.	Sumie AKIMOTO	Kokando Co., Ltd.
新田 洋美	株式会社広昌堂	本島 多可美	小太郎漢方製薬株式会社
Hiromi NITTA	Koshodo, Ltd.	Takami MOTOSHIMA	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.
喜多村 かおり	株式会社三九製薬	林 智子	大協薬品工業株式会社
Kaori KITAMURA	Sankyu Pharmaceutical Co., Ltd.	Tomoko HAYASHI	Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
上井 義和	ダイト株式会社	土肥 友恵	テイカ製薬株式会社
Yoshikazu KAMII	Daito Corporation	Tomoe DOI	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
大内 啓之	東亜薬品株式会社	広瀬 由香理	日医工株式会社
Hiroyuki OUCHI	Toa Medicine Co., Ltd.	Yukari HIROSE	Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.
釣谷 千尋	日東メディック株式会社	中島 可菜絵	株式会社富士薬品
Chihiro TSURITANI	Nitto Medic Co., Ltd.	Kanae NAKAJIMA	Fuji Medicine Co., Ltd.
下谷 貴子	明治製薬株式会社	田中 学	株式会社陽進堂
Takako SHIMOTANI	Meiji Pharmaceutical Co., Ltd.	Manabu TANAKA	Yoshindo Inc.
横田 洋一	富山県薬事研究所		
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research		

緒言

近年、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に使用する分析カラムにおいては、水組成比の高い移動相あるいは水 100%の移動相で分析が可能なのが市販されるようになった。水組成比の高い移動相で迅速に分析を行うことが可能になれば、使用する有機溶媒をさらに低減することが期待できる。今回、これらの分析カラムの分離特性を示すパラメーターを調べ、品質評価を行ったので報告する。

方法

大津らの方法¹⁾に準じて Table 1 の分析条件で行った場合の各成分について、ウラシル(U)を基準とした保持係数(k')及び理論段数(N)を計算し、分離特性を示す次の分離係数 $\alpha(k'/k')$ 及び理論段数比 $N(N_1/N_2)$ のパラメーターを求めた。①疎水性相互作用を示す $\alpha(T/B)$ 、②表面極性を示す $\alpha(Mb/T)$ 、③水素結合性を示す

α (Cf/Ph)、④イオン交換性を示す α (Ep/B)、⑤配位結合性を示すN(Pa/T)、⑥平面認識能 α (Tp/Ot)及び α (Ts/Cs)。なお、これらのパラメーターは3回求めたものの平均値で表した。また、薬事研究会としてウォーターズの粒子径1.7 μ mの分析カラムおよびそれに対応する装置(Ultra Performance Liquid Chromatography、UPLC)を使用する機会があったので、同様の分析を行った。評価した分析カラムは、Table 2に示した。

Table 1. 分析カラムの品質評価法

操作条件	1	2		
検出器	紫外吸光光度計(測定波長: 254nm)			
カラム	Table 2に示した。			
カラム温度	40°C付近の一定温度			
移動相	メタノール/水混液(1:1)	メタノール/水混液(4:1)		
流量	1.0mL/min(但し、Acquity BEH C18長さ5cmを使用したときは0.5mL/min、長さ10cmを使用したときは0.4mL/min。)			
注入量	5 μ L			
注入回数	3回			
試料溶液	ウラシル(U)	12.4 μ g/mL	ウラシル(U)	12.0 μ g/mL
	カフェイン(Cf)	30.6	cis-スチルベン(Cs)	26.0
	フェノール(Ph)	154.2	trans-スチルベン(Ts)	56.2
	2-エチルピリジン(E)	39.8	o-テルフェニル(Ot)	25.9
	安息香酸メチル(M)	25.1	トリフェニレン(Tp)	5.1
	ベンゼン(B)	1250.0	のメタノール溶液	
	N,N-ジメチルアニリン(D)	44.5		
	トルエン(T)	729.0		
	フェニルアセチルアセトン(Pa)	123.5		
		のメタノール溶液		

Table 2. 評価した分析カラム(*: 高極性物質用とされるカラム)

No.	カラムサイズ 粒子径	カラム名	カラムメーカー	略記
1	4.6mm i.d. \times 15cm, 5 μ m	TSKgel ODS-100V*	東ソー(株)	TSK
2		Inertsil ODS-SP*	ジーエルサイエンス(株)	Inertsil
3		Cosmosil 5C ₁₈ -PAQ*	ナカライテスク(株)	PAQ
4	4.6mm i.d. \times 7.5cm, 3 μ m	Develosil ODS-UG-3	野村化学(株)	UG
5		Develosil ODS-MG-3*		MG
6		Develosil ODS-HG-3		HG
7		Develosil C30-UG-3*		C30
8		Hydrosphere C18*		ワイエムシィ(株)
9		Unison UK-C18*	インタクト(株)	Unison
10	2.1mm i.d. \times 5cm, 1.7 μ m	Acquity BEH C18	ウォーターズ(株)	UPLC5
11	2.1mm i.d. \times 10cm, 1.7 μ m	Acquity BEH C18		UPLC10

結 果

同一分析カラムを用いた場合でも、2-エチルピリジンのピーク形状が異なったため、2-エチルピリジンの分離係数や理論段数を用いたパラメーター、即ち、 α (Ep/B)、N(Ep/T)は信頼性に乏しく、今回は参考程度である。操作条件1及び2で分析を行ったときのHPLCクロマトグラムをFig. 1及び2に、UPLCクロマトグラムをFig. 3に示した。HPLCにおいて、粒子径5 μ m、4.6mm i.d. \times 15cmのTSKgel ODS-100Vを用いた場合、フェニルアセチルアセトンの保持時間が28.8分であったのに対し、粒子径4.6mm i.d. \times 7.5cmのDevelosil ODS-UG-3では10.7分であり、移動相使用量を半分以下にした。さらにUPLCにおいて、カラム長さ10cmでは6.5分で、5cmで1.9分となった。粒子径が細かく、カラムが短くなるにつれて、分離もほぼ維持されながら、溶出が早くなった。移動相使用量は節減可能のみならず、生産性向上にも期待される。

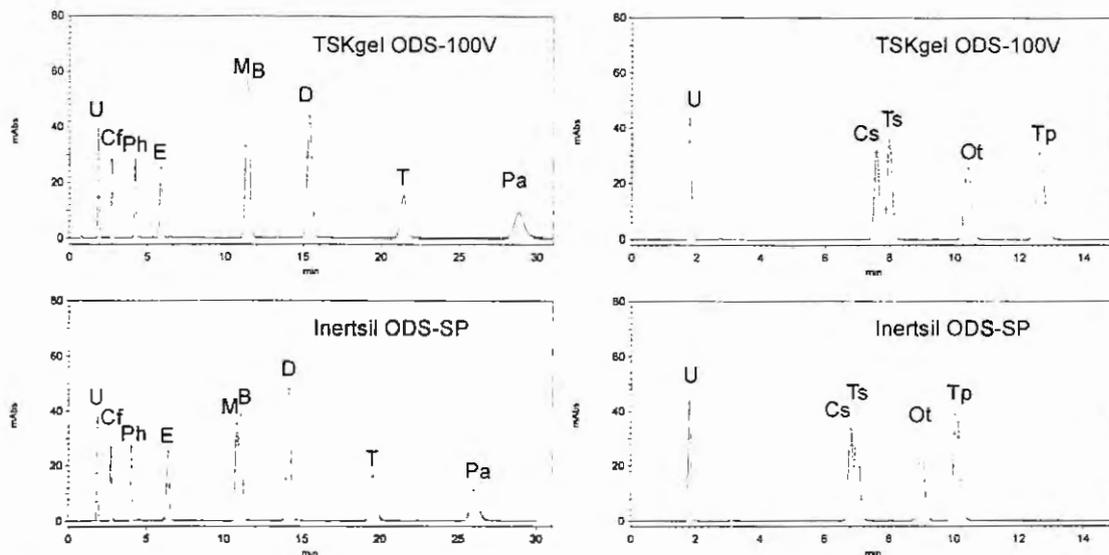


Fig. 1. HPLC クロマトグラム (4.6mm i.d.×15cm、5 μ m、左が操作条件 1、右が操作条件 2)

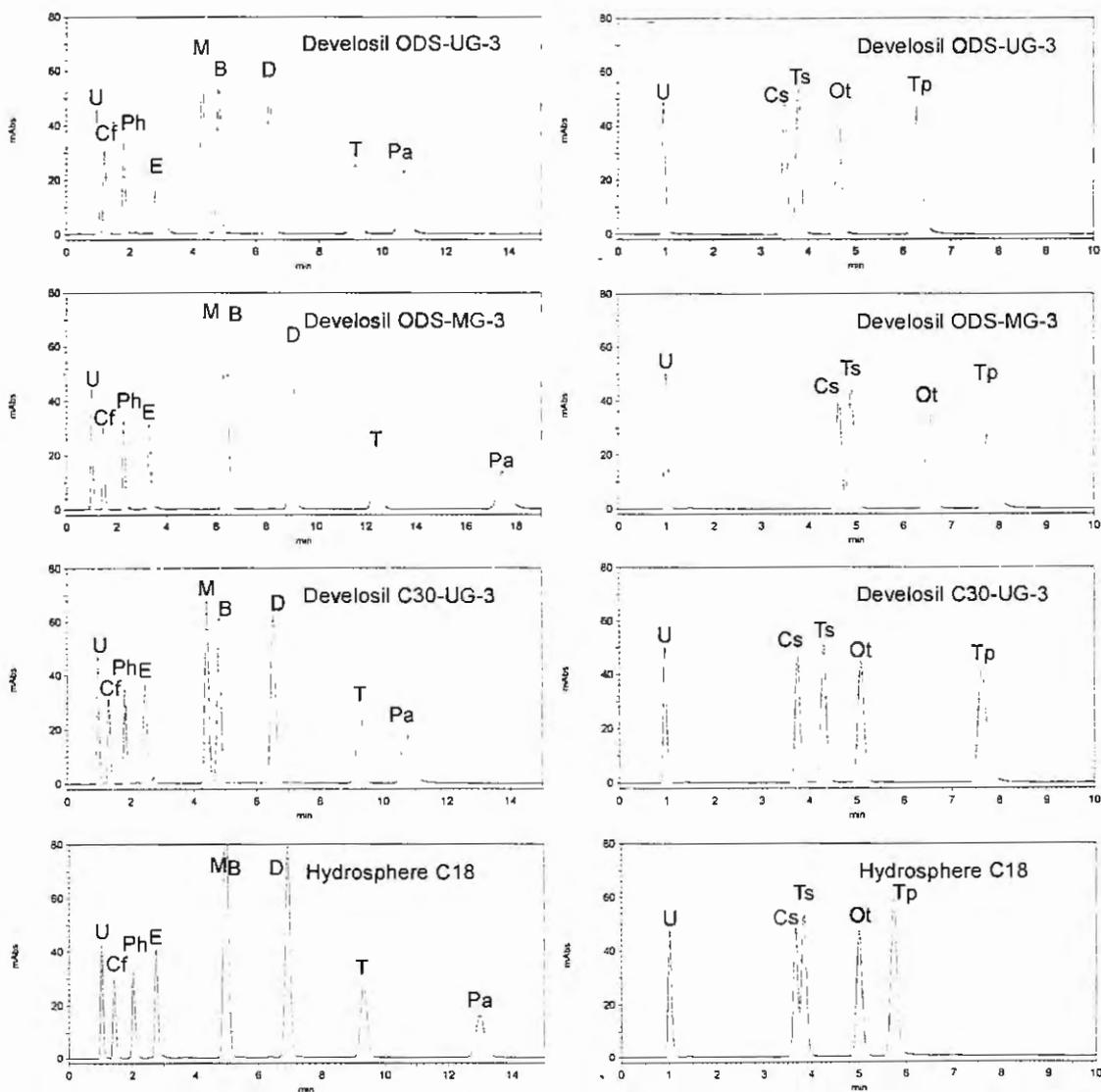


Fig. 2. HPLC クロマトグラム (4.6mm i.d.×7.5cm、3 μ m、左が操作条件 1、右が操作条件 2)

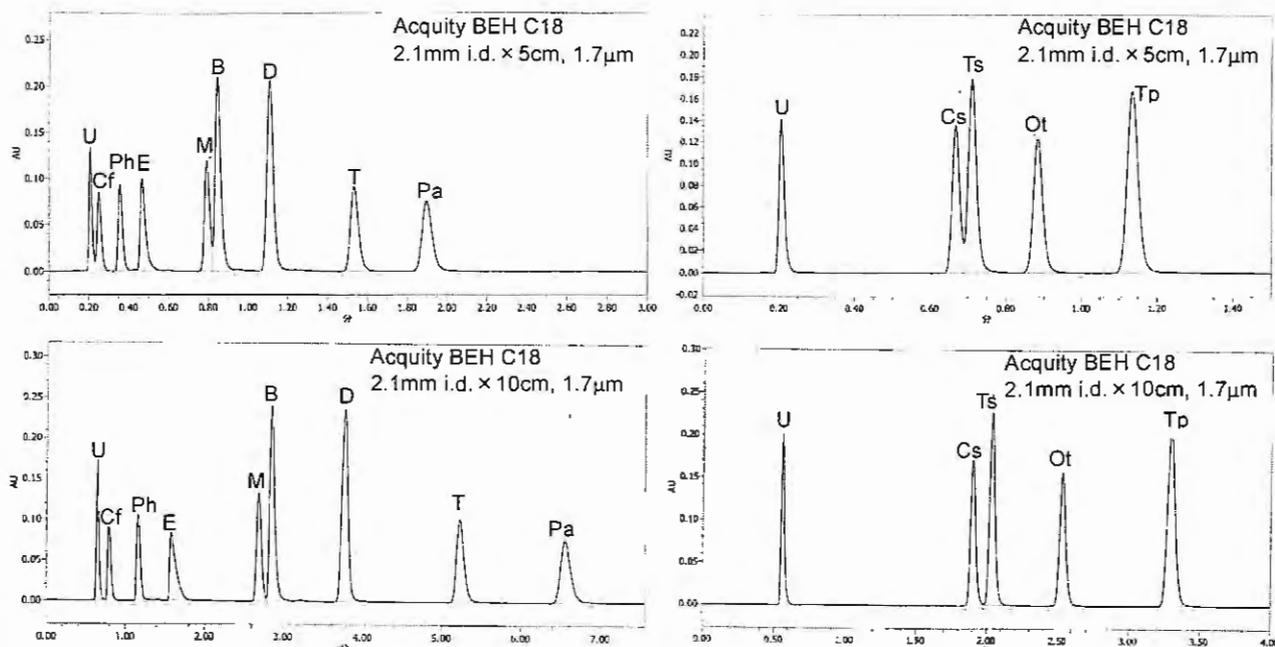


Fig.3. UPLC クロマトグラム (左が操作条件 1、右が操作条件 2)

Table 3. 分析カラムのスペック

サイズ及び粒子径	4.6mm i.d. × 15cm、5 μ m				4.6mm i.d. × 7.5cm、3 μ m						1.7 μ m	
	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
カラム	略記	TSK	Inertsil	PAQ	UG	MG	HG	C30	YMC	Unison	UPLC 5	UPLC 10
炭素含量(%)		15	8.5	11	18	15	18	18	12		18	18
孔径(\AA)		100	100	120	140	100	140	140	120	130	130	130
比表面積(m^2/g)		450	450	300	300	450	300	300	330			
エンドキャッピング		有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り
結合様式		モノメリック	モノメリック	ポリメリック	モノメリック	ポリメリック	ポリメリック	モノメリック	モノメリック	ポリメリック	ポリメリック	ポリメリック

Table 4. 分析カラムの分離特性を示すパラメーター (* : 高極性物質用とされるカラム)

サイズ及び粒子径	4.6mm i.d. × 15cm、5 μ m				4.6mm i.d. × 7.5cm、3 μ m						1.7 μ m	
カラム	No.	1*	2*	3*	4	5*	6	7*	8*	9*	10	11
疎水性	α (T/B)	2.02	1.93	1.90	2.12	2.12	2.08	2.16	2.11	2.08	2.08	2.08
表面極性	α (Mb/T)	0.54	0.56	0.58	0.47	0.51	0.48	0.48	0.53	0.50	0.52	0.51
水素結合性	α (Cf/Ph)	0.38	0.40	0.29	0.29	0.37	0.29	0.40	0.39	0.34	0.29	0.29
イオン交換性	α (Ep/B)	0.41	0.49	0.40	0.46	0.42	0.59	0.36	0.42	0.50	0.41	0.42
	N(Ep/T)	0.58	0.41	0.30	0.18	0.32	0.09	0.24	0.39	0.13	0.24	0.14
	N(Da/T)	0.97	0.94	0.82	0.97	1.04	0.76	0.80	0.92	0.87	0.82	0.74
配位結合性	N(Pa/T)	0.87	0.95	0.88	0.98	1.00	0.92	0.63	1.07	0.89	0.99	0.92
平面認識能	α (Tp/Ot)	1.27	1.15	1.38	1.48	1.25	1.55	1.65	1.18	1.42	1.37	1.39
	α (Ts/Cs)	1.07	1.01	1.09	1.13	1.07	1.14	1.21	1.07	1.10	1.10	1.10
圧力 (kgf/cm^2)	条件 1	77	95	95	112	109	114	104	114	102	900~1000 程度	
	条件 2	55	81	71	86	87	82	80	92	72		

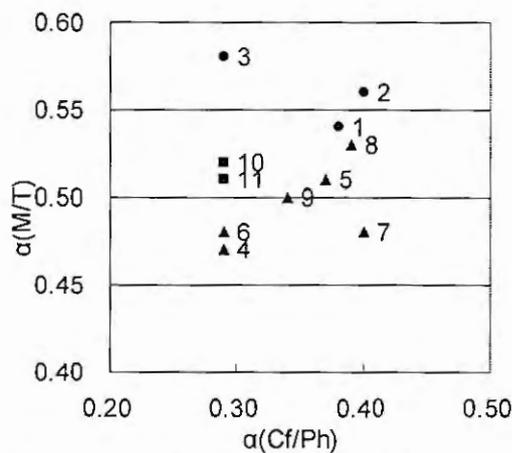


Fig. 4. 表面極性と水素結合性の関係
図中の数字はカラムNo.

各分析カラムのスペックを Table 3 に、分離特性を示すパラメータ値を Table 4 に示した。疎水性相互作用を示す $\alpha(T/B)$ は、一般にカーボン量が多い充填剤ほど高くなる傾向を示す。今回評価した中では、Inertsil ODS-SP、Cosmosil 5C₁₈-PAQ は疎水性相互作用が低かった。これらのカラムは、炭素含量がそれぞれ 8.5%、11% と低いためと考える。なお、Inertsil ODS-SP は炭素含量が低くても、比表面積が他に比べて大きいので、成分保持が可能と思われる。Develosil C30-UG-3 は 2.16 で、アルキル鎖が ODS よりも長い割には通常の分析に使用される ODS カラム程度であった。アルキル鎖が長くても炭素含量が他の分析カラムと同程度の 18% であるため、官能基の結合密度が低く、通常使用する移動

相では ODS カラムのように分析が可能と考えられる。

表面極性を示す $\alpha(Mb/T)$ が小さい程、極性物質は早くシャープに溶出する。また、水素結合性は残存シラノール基などの水酸基に依存するが、エンドキャッピングが良好な充填剤ほど小さい値を示す傾向がある。Fig. 4 には表面極性と水素結合性の関係を示したが、一般に、水素結合性と表面極性は相関する場合が多い。評価した分析カラムの中で、Cosmosil 5C₁₈-PAQ は水素結合性が最も低く、かつ表面極性が大きいので、エンドキャッピングが強固に施され、残存シラノール基の影響を受けにくく、極性物質をシャープに溶出させるものと思われる。

$\alpha(Tp/Op)$ が大きいほど平面認識能が高く、非平面化合物 Ot より平面的な Tp のほうが保持されやすいことを示している。一般にポリメリック ODS が高い値を示すことが知られているが、モノメリックであっても Develosil ODS-UG-3 は $\alpha(Tp/Op)$ が 1.48 と比較的高い。なお、アルキル鎖の長い Develosil C30-UG-3 は $\alpha(Tp/Op)$ が 1.65 と最も高く、また $\alpha(Ts/Cs)$ は 1.21 であり、立体異性体の分離にも期待できる。

移動相溶媒にメタノールを用いると圧力が高くなるが、このような移動相条件でも通常使用する HPLC 装置には耐え得るものであった。

カラムメーカー各社より高極性物質の分離用に種々の分析カラムが開発されており、それぞれに特徴があることが明らかになった。水組成比の高い移動相を用いることによって、HPLC による分析法が確立できれば、有機溶媒使用量の削減可能につながると期待される。なお、今回の評価では平均的なパラメータ一値になったのは Hydrosphere C18 であるが、今までの利用実績を考慮に入れると、これ以外の分析カラムには耐久性があるのか、あるいは天然物のような複合成分の分析は可能なのかなど検討が必要と思われる。

引用文献

- 1) 大津他、クロマトグラフィー、11(4)、48-49 (1990)

ウヤクおよびウヤク葉のマウスにおける抗肥満作用

Anti-obese effects of *Linderae Radix* and *Lindera strychnifolia* leaf in mice

永井 秀昌
Hidemasa NAGAI

松原 利行
Toshiyuki MATSUBARA

富山県薬事研究所
Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒言

メタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患の危険性を高める複合型リスク症候群である。メタボリックシンドロームは内臓脂肪蓄積を起因とする生活習慣病（肥満・高血圧症・糖尿病・高脂血症）の重なりによって引き起こされるが、その予防及び治療には多くの課題が残されている。特に、現在日本において臨床使用が認められている抗肥満薬剤はマジンドールのみであり、有効性が高く安全な抗肥満薬の開発が求められている。そこで今回、マウスを用いてウヤクおよびウヤク葉の抗肥満作用を検討した。

ウヤクはクスノキ科テンダイウヤク (*Lindera strychnifolia*) の根を乾燥したものであり、健胃整腸作用があるために腹痛や疝痛、頻尿、月経痛などに用いられる。ウヤク葉はテンダイウヤクの葉であり、これはウヤクと同様に健胃薬として民間療法で用いられている。近年、ウヤクの熱水抽出エキスに糖尿病性腎症の伸展を遅らせる作用¹⁾や、動脈硬化抑制作用²⁾が報告されている。また抗肥満作用として、浅野らによってウヤクの β_3 アドレナリン受容体刺激による脂肪分解促進作用が報告されている³⁾。

実験方法

1. 実験材料

ウヤクは池田屋安兵衛商店より購入したものを粉末にして用いた。ウヤク葉は富山県薬用植物指導センター（富山県上市町）で栽培されたテンダイウヤクより2006年7月と9月に採取した。採取した葉は自然乾燥後粉碎し、粉末飼料と混ぜ合わせた。

2. ウヤクの投与実験

ウヤク3%および6%を2日間ICR系雄性マウスに混餌投与し、体重、摂餌量、胃内容物重量を測定した。

3. ウヤク葉の投与実験

Gold thioglucose (GTG)をICR系雌性マウスに腹腔内投与し(0.3 g/kg)、通常固形食で16週飼育し、肥満マウスを作成した。肥満マウスに対してウヤク葉(2%、4%)を9週間投与した。

1) 血漿トリグリセライド、血漿コレステロール及び脂肪組織重量の測定

ウヤク葉投与9週後に眼窩静脈叢より採血し、5000 rpmで10分間遠心分離して血漿を得た。血漿トリグリセライド、血漿コレステロール濃度は自動血液生化学分析装置（富士ドライケム

3000; 富士写真フィルム株式会社)により測定した。また実験終了後開腹し、傍子宮脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織を摘出し、重量をそれぞれ測定した。

2) 血漿アディポネクチン濃度の測定

血漿アディポネクチン濃度は前項で採取した血液を用いて、マウス/ラットアディポネクチン ELISA キット(大塚製薬株式会社)を用いて ELISA 法により測定した。

結 果

1. ウヤク混餌投与における体重および胃内容物重量に対する作用

ウヤクを2日間マウスに混餌投与(3%、6%)し、体重変化、胃内容物重量および摂餌量を測定した。その結果、6%投与群に有意な体重増加の抑制作用と胃内容物重量の増加作用が認められた(表1)。

表1 ウヤク混餌投与によるマウス体重・胃内容物重量に対する作用

被検体	体重変化量 (g)		胃内容物重量 (g)	摂餌量 (g/日/匹)
	1日目	2日目		
対照群	0.33±0.35	0.60±0.29	0.34±0.08	6.96
3%ウヤク	-0.45±1.14	0.25±1.22	0.55±0.1	3.64
6%ウヤク	-1.62±0.79**	-1.60±1.64*	0.65±0.21**	2.23

平均値±標準偏差 (n=5)、*、** : $p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. 対照群 (Dunnett's test)

2. ウヤク葉混餌投与の結果

1) 体重に対する影響

マウスに GTG 0.3 g/kg を腹腔内投与した群では、GTG 投与後 15 週目で無処置群に比べ 1.7 倍、25 週目 (79.0±2.4 g) で無処置群 (43.3±2.4 g) に比べ 1.8 倍の体重に達しており、肥満病態を呈していることが確認された。GTG 誘発肥満マウスに対し、ウヤク葉 2% および 4% を投与した群では投与後 7 週目より対照群に比べて有意な体重増加抑制作用が認められた(図 1)。

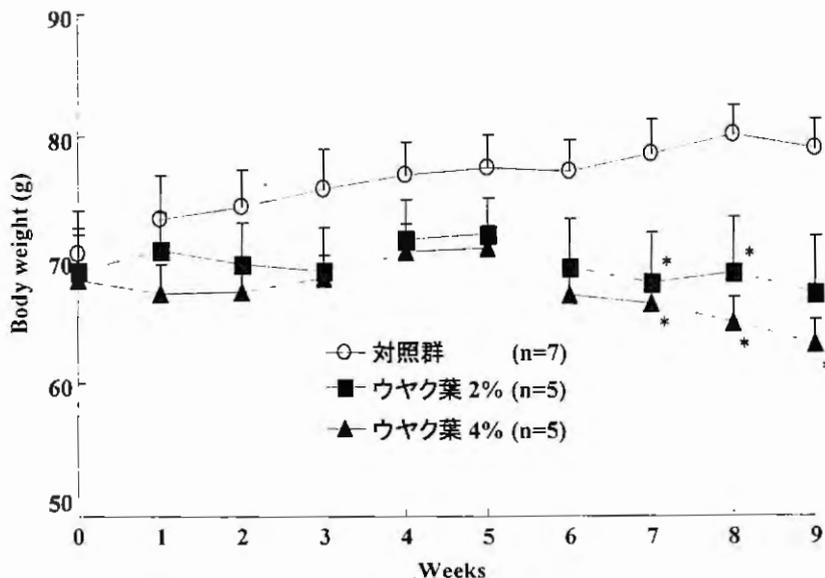


図1 ウヤク葉投与による体重増加抑制作用

図中の各点は 5-7 例の平均値±標準誤差を示す。* : $p < 0.05$ vs. 対照群 (Fisher's Protected LSD test)

2) 摂餌量および飲水量に対する影響

摂餌量および飲水量は毎週測定し、4-5週間の平均値を図に示した(図2)。ウヤク葉投与後6-9週で2%、4%投与群に有意な低下が認められた。

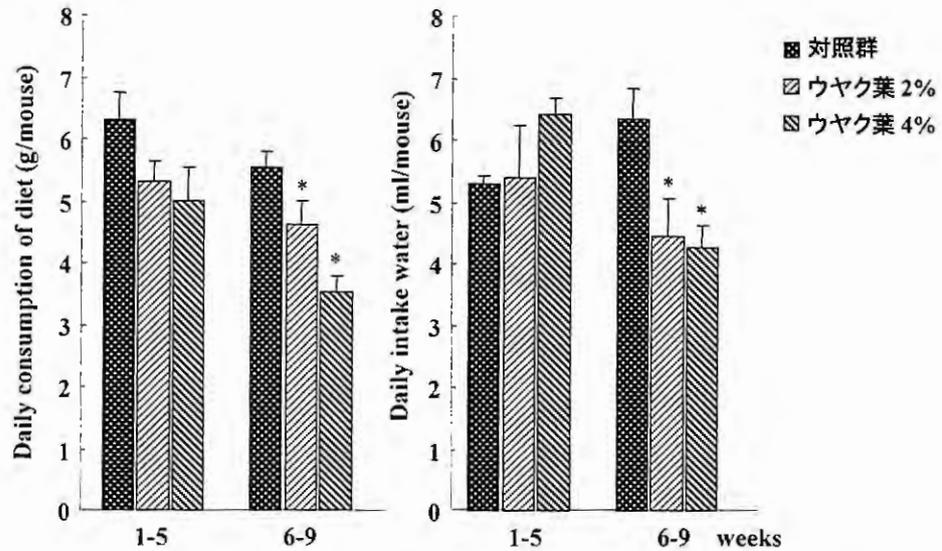


図2 ウヤク葉投与による摂餌量(左図)および飲水量(右図)の変化

図中の各カラムは平均値±標準誤差を示す。*: $p < 0.05$ vs. 対照群 (Fisher's Protected LSD test)

3) 血漿トリグリセライド、血漿コレステロール濃度と内臓脂肪量に対する作用

ウヤク葉投与後9週目に採血を行った結果、ウヤク葉4%投与群にトリグリセライド値が低下する傾向が認められたが、コレステロール値に変化は認められなかった(図3)。また開腹し、内臓脂肪組織量を測定したところ、ウヤク葉2%、4%投与群において腸間膜と腎周囲脂肪組織量に有意な蓄積抑制作用が認められ、ウヤク葉2%投与群では傍子宮脂肪組織量にも有意な抑制作用が認められた(図4)。特に腸間膜脂肪組織量の抑制作用が顕著であり、体重当たりの組織重量として計算した場合においても、同様の抑制作用が確認された(Data not shown)。

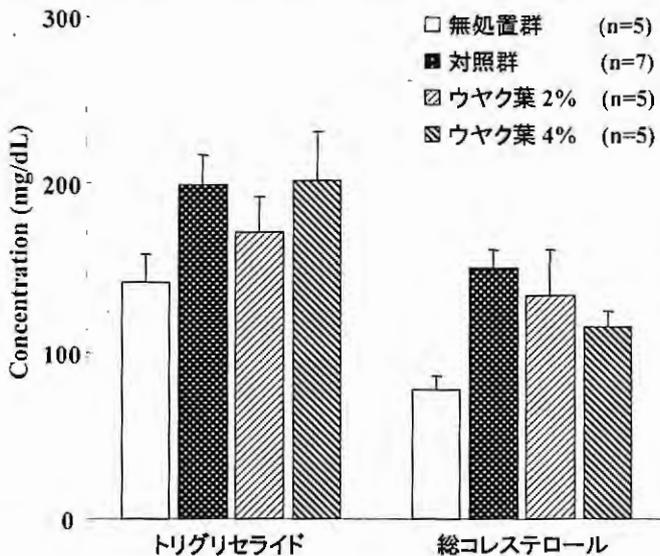


図3 ウヤク葉投与による血漿トリグリセライド・総コレステロール量の変化

図中の各カラムは5-7例の平均値±標準誤差を示す。

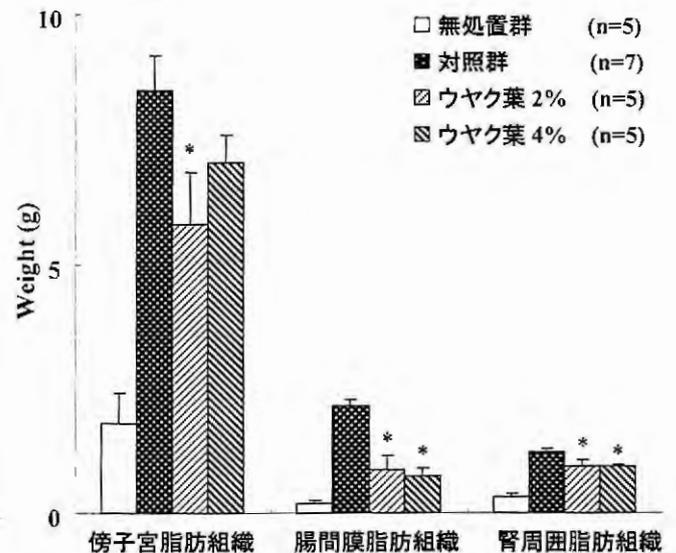


図4 ウヤク葉投与による内臓脂肪量の変化

図中の各カラムは5-7例の平均値±標準誤差を示す。*: $p < 0.05$ vs. 対照群 (Fisher's Protected LSD test)

4) 血漿アディポネクチン濃度に対する作用

血漿アディポネクチン濃度を ELISA 法で測定した結果、ウヤク葉投与群では対照群との間に有意な差は認められなかった(図 5)。

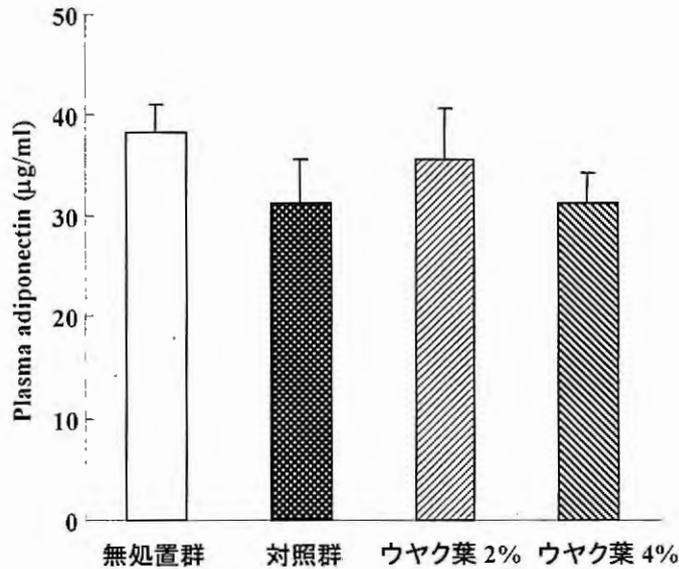


図5 ウヤク葉投与による血漿中アディポネクチン量
図中の各カラムは 5-7 例の平均値±標準誤差を示す。

考 察

ウヤクを混餌投与した結果、体重増加の抑制作用と胃内容物重量の増加作用が見られ、抗肥満作用を有する可能性が示唆された。作用機序として摂食中枢への抑制作用、または胃排出能や腸管輸送能へ関与する可能性も考えられる。このため、医薬品ではないウヤク葉を用いて、肥満マウスに対する抗肥満作用を詳細に検討した。

現在用いられている肥満モデル動物としては、視床下部性肥満モデル、遺伝性肥満モデル、食餌性肥満モデルの 3 種類のモデル動物がある。今回使用した肥満モデルは視床下部性肥満モデルであり、GTG を腹腔内に投与することにより作製した。GTG は視床下部の弓状核に存在する摂食抑制ペプチドのニューロンを破壊し、過食と肥満を誘発することが報告されている⁴⁾。我々はこれまでに、GTG 投与肥満マウスでは、著しい体重増加が認められること、GTG 投与後 20 週以降で血漿中アディポネクチン濃度が正常マウスに比べて低下することを報告している⁵⁾。

実験の結果、ウヤク葉 9 週間混餌投与によって、体重の増加抑制作用および腸間膜脂肪組織・腎周囲脂肪組織量の蓄積抑制作用が認められた。このため、ウヤク葉は GTG 誘発肥満マウスに対して抗肥満作用があると考えられる。一方、ウヤク葉混餌投与によって血漿中アディポネクチン量に変化は認められなかった。結果には示していないが、3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いてウヤク葉熱水抽出エキスおよび MeOH 抽出エキスの脂肪細胞分化に与える影響を検討したが、分化に対する作用は認められなかった。これらの結果より、ウヤク葉には脂肪細胞からのアディポネクチン分泌作用には影響を与えないと考えられる。

また、ウヤク葉混餌投与によって摂餌量の低下が認められたものの、ウヤク葉粉末の味やにおいては弱く、忌避反応によるものとは考えにくい。このため、摂餌量の低下は摂食中枢等への食欲抑制

作用によるものと考えられる。食欲抑制作用には、脳内の神経伝達物質であるモノアミンの再取り込みを阻害する機序が知られており、現在日本で治験中の抗肥満薬シブトラミン（セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤）がその例である⁶⁾。よってウヤク葉の食欲抑制作用にはこのような摂食中枢のメカニズムが関連することも推測され、今後の検討が必要である。さらにウヤク葉の鮮度によって、摂餌量や体重増加抑制の程度に影響が見られていることから、有効成分は精油等の揮発成分であること、もしくは分解しやすいことが推測され、有効成分の安定性の検討が必要である。さらに安全性の検討も重要であり、今後慎重に検討する必要があると考えられる。

以上本研究によって、ウヤクおよびウヤク葉は抗肥満作用を有する可能性が示唆された。特にウヤク葉は GTG 誘発肥満マウスに対して、体重増加の抑制作用ならびに脂肪組織量の蓄積抑制作用を示すことを明らかにした。また、その作用機序として食欲抑制作用が示唆された。

文 献

- 1) Ohno T., Takemura G., Murata I., Kagawa T., Akao S., Minatoguchi S., Fujiwara T., Fujiwara H.: Water extract of the root of *Lindera strychnifolia* slows down the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Life Sci.* 77, 1391-1403 (2005).
- 2) Tomii M., Song Q-H., Mori Y., Cyong J-C.: The effects of Kampo herbal medicines (Scutellariae Radix, Carthami Flos, Linderae Radix) on the atherosclerosis mouse model introduced with heat shock protein(Hsp) 60 and high cholesterol diet. *J. Trad. Med.* 19216-222 (2002).
- 3) 浅野年紀, 森戸 暁久: 肥満の予防または改善用組成物, 公開特許公報, 特許公開 2004-262928
- 4) 本間明子, 川野仁, 本間静, 川野囚: 金硫化グルコース(GTG)投与による視床下部の破壊と肥満誘導のメカニズム. *肥満研究*, 9, 108-113 (2003).
- 5) 永井秀昌, 松原利行: 金チオグルコース投与肥満マウスにおける血漿中アディポカイン濃度の変動解析, 富山県薬事研究所年報, 33, 18-22 (2006).
- 6) Heal DJ., Aspley S., Prow MR., Jackson HC., Martin KF., Cheetham SC.: Sibutramine: a novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22, 18-28 (1998).